accura-expRACE KIT

[ækjurə-ikspré(i)s]

エルプレイン研究所

El Plain Institute

Revolutionary
Tools for
Continual
Discovery

Code No.	EPI001
Lot No.	0001
Storage	–20℃

本製品は研究目的の使用のために販売しています。医薬品･診断用医薬品･食品･化粧品等としては使用できません。人体には決して使用しないよう注意をお願いします。

目次

I. キット構成品 3
A. First-Strand cDNA 合成 3
B. Second-Strand cDNA 合成 3
C. その他の試薬 3
D. RACE PCR 3
II. キット構成品以外に必要な材料 4
III. First-Strand cDNA 合成 4
IV. Second-Strand cDNA 合成 5
V. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 6
A. RACE PCR 7
B. クローニングと DNA 塩基配列の決定 8
C. コントロール m*Tfrc* 5'および 3' RACE プライマーの用い方 8
D. コントロールプライマーによる RACE PCR と RT-PCR の実施例 9
E. RACE によってより長い cDNA を得たい場合 10
VI. 問題の発生とその解決法 10
A. ds cDNA 合成 10
B. RACE 11
C. 希少な転写産物の RACE 11
D. Genomic DNA の偶発的な増幅 11
VII. シングルプライマーRACE 法の重要な特性と応用 11
VIII. Conclusion 推断 12
IX. 参考文献 12

取扱説明書

本キットには 5 回の cDNA 合成と RACE PCR に必要な試薬が含まれています。熱安定性 DNA ポリメラーゼは含まれていません。poly(A)$^+$ RNA を精製することが必要です*。

I. キット構成品

A. First-Strand cDNA 合成

1. 100 µl　5X RTase (Reverse Transcriptase) Buffer
   250 mM Tris-HCl, pH 8.3
   375 mM KCl
   15 mM $MgCl_2$
2. 10 µl　Oligo(dT)$_{20}$ Primer (10 µM)
3. 5.5 µl　M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (改良型) (50 U/µl)
   起源：組換え体大腸菌で発現・精製

B. Second-Strand cDNA 合成

4. 200 µl　5X Second-Strand Synthesis Buffer
   100 mM Tris-HCl, pH 7.5
   500 mM KCl
   25 mM $MgCl_2$
   50 mM $(NH4)_2SO_4$ (Ammonium Sulfate)
   5 mM Dithiothreitol (DTT)
   0.25 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)
   0.75 mM β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide (β-NAD)
5. 5.5 µl　*E. coli* RNase H (1 U/µl)　起源：組換え体大腸菌で発現・精製
6. 5.5 µl　*E. coli* DNA Ligase (5 U/µl)　起源：組換え体大腸菌で発現・精製
7. 11 µl　*E. coli* DNA Polymerase I (12 U/µl)　起源：組換え体大腸菌で発現・精製
8. 300 µl　EDTA (0.5 M EDTA, pH 8.0)

C. その他の試薬

9. 40 µl　10 mM dNTP Mix (10 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
10. 500 µl　7.5 M Ammonium Acetate
11. 1.7 ml　滅菌水 Distilled Water, Deionized, Sterile
12. 1.6 ml　TE, pH 8.0
    10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
    1 mM EDTA (pH 8.0)

D. RACE PCR

Control 5' and 3' RACE Primers

13. 200 µl　Mouse Transferrin Receptor (*Tfrc*) 5' RACE Primer (10 pmol/µl): 5'-TTCTCAGGTGGCAGCTTTGAACT-3' (Tm 62.58℃)
14. 200 µl　Mouse Transferrin Receptor (*Tfrc*) 3' RACE Primer (10 pmol/µl): 5'-CGTGGAGACTACTTCCGTGCTAC-3' (Tm 62.55℃)
    (Full-length cDNA ~4.9 kb)

註）各キット構成品は、ほぼ実験で使用する順序に合わせてケースの手前・左から右へ、次の列・左から右へと並んでいます。

* BioMag® mRNA精製キット(Polysciences)、NucleoTrap® mRNA (MACHEREY-NAGEL)、FastTrack® 2.0 mRNA Isolation Kit (Life Technologies)、Absolutely mRNA Purification Kit (Agilent Technologies)等を使用してpoly(A)$^+$ RNAの精製を行なうことができます。

II. キット構成品以外に必要な材料

1. 熱安定性 DNA Polymerase (PrimeSTAR (TaKaRa), KOD (TOYOBO), Pfu (Thermo Fisher Scientific), Phusion (New England Biolabs), etc.)
2. Phenol (TE, pH 8.0 飽和)
3. 99.5% Ethanol
4. 75% Ethanol
5. TE, pH 8.0

III. First-Strand cDNA 合成

本方法は、逆転写の効率を上げるために開発された改良型逆転写酵素 M-MLV RTase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)を使用した cDNA 合成法です。この酵素は伸長性が非常に向上しており、長い First-Strand cDNA を合成することができます。また GC リッチなど高次構造を形成しやすい RNA 領域でも、通常の逆転写反応温度 42℃で効率良く First-Strand cDNA を合成することができます。本方法は完全長 cDNA の比率が高い cDNA ライブラリーの作製に非常に適しています。

First-Strand cDNA 合成反応溶液の組成

5X RTase Buffer	2 μl
10 mM dNTP	1 μl
10 μM Oligo(dT)$_{20}$	1 μl
poly(A)$^+$ RNA	1 μg (1~5 μl)
M-MLV RTase (改良型) (50 U/μl)	1 μl
滅菌水	(4~0) μl
Total volume	10 μl

1. poly(A)$^+$ RNA、Oligo(dT)および滅菌水を氷中で融かす。0.5 ml の滅菌済みチューブを氷中に立てる。また 5X RTase Buffer、10 mM dNTP Mix も氷中で融かす。
2. 1 μg の poly(A)$^+$ RNA (1~5 μl)と Oligo(dT) Primer 1 μl を 0.5 ml の滅菌済みチューブに加える。
3. 滅菌水を加えて 6 μl にする。
4. 数回のピペッティングによって良く混合した後、4℃に設定した微量高速遠心機で軽く遠心する。
5. 70℃で 3 分間インキュベートする。
6. 氷中で 3 分間冷やす。
7. 4℃に設定した微量高速遠心機で軽く遠心して溶液をチューブの底に落とす。
8. 次のものを反応チューブに加える。

5X RTase Buffer	2 μl
10 mM dNTP	1 μl
M-MLV RTase (改良型) (50 U/μl)	1 μl
Total volume	10 μl

9. ピペッティングによって穏やかによく混合する。
10. 4℃に設定した微量高速遠心機で軽く遠心する。
11. 42℃で 1 時間インキュベートする。(インキュベーター(恒温器)が好ましいが、ヒートブロックに蒸留水を張り蓋をする等でも良い。)
12. 反応チューブを氷中に 2~3 分間立てて反応を止める。
13. 同じ反応チューブで、続けて Second-Strand cDNA 合成に進む。

IV. Second-Strand cDNA 合成

Second-Strand cDNA 合成は同じ反応チューブに下記の試薬を加えて行います。RNaseH、*E. coli* DNA Polymerase I および *E. coli* DNA Ligase によって RNA-DNA ハイブリッドの RNA が分解されて Second-Strand cDNA が合成されます(1, 2)。本キットによる RACE 法では、合成した Double-Stranded (ds) cDNA にアダプターやアンカー等をライゲーションする必要がないので、T4 DNA Polymerase を用いて ds cDNA の末端を平滑端にする必要はありません。ds cDNA 合成が終わるとすぐに RACE 実験に移行することができます。

1. 5X Second-Strand Buffer、dNTP Mix、滅菌水を氷中で融かす。
2. 次のものを First-Strand cDNA 反応チューブに加える。

(First-Strand Mix	10 μl)
滅菌水	48.4 μl
5X Second-Strand Buffer	16 μl
dNTP Mix (10 mM)	1.6 μl

Vortex で短時間軽く混合し軽く遠心した後、酵素を加える。

E. coli RNase H 1U	1 μl
E. coli DNA Ligase 5U	1 μl
E. coli DNA Polymerase I 24U	2 μl
Total volume	80 μl

3. 穏やかなピペッティングによってよく混合する。
4. 4℃に設定した微量高速遠心機で軽く遠心して反応液をチューブの底に落とす。
5. 16℃で 1.5 時間インキュベートする。
6. 1.6 μl の 0.5 M EDTA, pH 8.0 を加えて反応を停止する。
7. 80 μl のフェノール(TE, pH 8.0 飽和)を加えて良く Vortex する。
8. 微量高速遠心機の最大速度(~15,000 rpm)で、室温で 10 分間遠心する。
9. 水層を 0.5ml の滅菌チューブに回収する。
10. 7.5 M Ammonium Acetate (酢酸アンモニウム)を 29 μl 加える。(最終濃度 2 M)
11. 2.5 倍量の 99.5%エタノール(272.5 μl)を加えて、チューブを転倒して良く混合する。
12. チューブを–20℃で約 1 時間冷やす。
13. 微量高速遠心機の最大速度(~15,000 rpm)で、4℃で 20 分間遠心する。
14. 上清を、ピペットマンを用いて慎重に取り除く。
15. –20℃で冷やした 75%エタノール 400 μl を静かに加える。
16. 微量高速遠心機の最大速度(~15,000 rpm)で、4℃で 5 分間遠心する。
17. 上清を、ピペットマンを用いて慎重に取り除く。
18. ペレット*を乾燥する。5~10 分間静置してエタノールを蒸発させる。

*ペレットがほとんど見えない場合もあります。

19. 10 μl の TE, pH 8.0 を加えて溶解する。
20. 1 μl の ds cDNA を最終濃度が 0.2~0.4 μg/ml になるように 250~500 μl の TE, pH 8.0 で希釈する。

cDNA 合成の確認

[α-^{32}P]dCTP ラベルによる cDNA 合成のモニタリングの代わりに、最終産物 (19. 10 μl TE, pH 8.0 溶液)の一部(例: 1 μl)をアガロースゲル電気泳動して ds cDNA 合成の成否を確認することができます(図 1)。

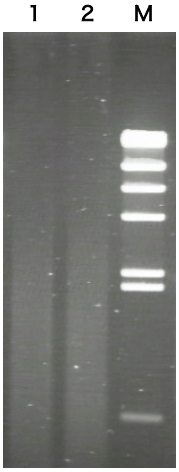


図 1. ds cDNA 合成の結果

ds cDNA 合成はマウス精巣 poly(A)$^+$ RNA を用いて行なった。1 μl cDNA を 1 %アガロースゲル電気泳動した結果を示している。レーン 1、2: それぞれ別のキットで合成した ds cDNA、レーン M: λ *Hin*dIII digestion マーカー

期待される結果

1 μg の poly(A)$^+$ RNA からは 0.2~1 μg の ds cDNA が得られることが期待されます。

V. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) (3, 4)

本キットで使用しているシングルプライマー法[*1] による RACE ではアダプタープライマーあるいはアンカープライマーを使用しません。1 種類の遺伝子特異的プライマーのみでターゲット cDNA を増幅します(5)。そのメカニズム(図 2, p7)は、遺伝子特異的プライマーを含む 2 本鎖 DNA の末端が、λ ファージの付着端(*cos*)で観察されるように、PCR の伸長反応(68℃)の際に部分的に変性していること、および DNA 分子が環状になり易い傾向がある(6, 7, 8)ことに基づいています。鋳型 DNA 鎖の 5 ’末端まで合成を終えた熱安定性 DNA ポリメラーゼが、DNA が環状になりその触媒部位へ侵入した娘鎖の 5’端領域に、ある頻度[*2] で乗り換え(Template-switching)を起こして遺伝子特異的プライマーに相補的な塩基配列を 3’末端に持つ DNA(娘鎖)を合成します。これが鋳型になって 1 種類の遺伝子特異的プライマーのみでターゲット遺伝子の cDNA が効率的かつ正確に増幅されます。その結果、合成された cDNA は特徴的な構造—遺伝子特異的プライマーとその 3’フランキング配列数塩基～十数塩基(含まれない場合もあります)から成る末端逆方向繰返し配列(Terminal Inverted Repeat) (9, 10, 11, 12, 13)—を形成します(図 2 凡例)。

上で合成した ds cDNA を PCR の鋳型に用いることによって、5’ RACE および 3’ RACE の両方を行うことができます。

[*1] シングルプライマー法は日本国特許第 4,304,350 号、U.S. patent No. 7,504,240 によって保護されています。

[*2] 正確な頻度は現時点では解っていません。DNA のサイズにより異なると考えられます。また使用する熱安定性 DNA ポリメラーゼによっても異なる可能性が考えられます。

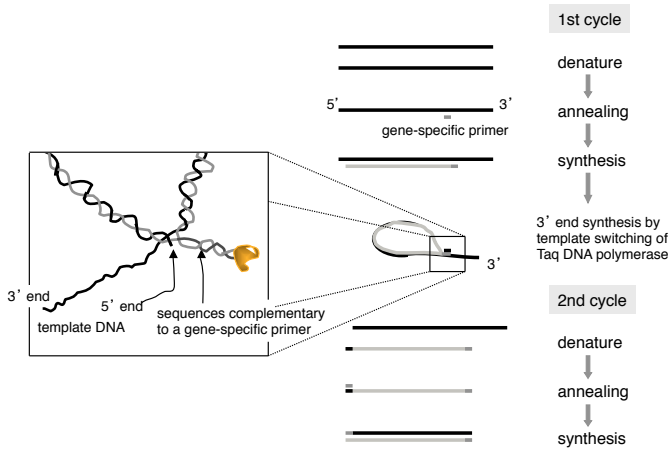


図 2. シングルプライマー法による RACE 反応のメカニズム

鋳型 DNA の 5'末端に到達した熱安定性 DNA ポリメラーゼは娘鎖の 5'端領域の様々な位置に乗り換え(Template-switching)を起こすと推測されますが、十数回のシングルプライマーRACE 実験で得られた全ての cDNA クローンで、末端逆方向繰返し配列(Terminal Inverted Repeat)の長さは 24~34 bp の範囲内になりました(5 および未発表データ)。この結果は以下のように説明することが可能だと思われます。68℃で部分変性するのは ds cDNA の末端の約 40 bp 以内に限られることが主要な原因と考えられます。この部分変性の長さは DNA の GC 含有量にも左右されると推測されます。さらに、遺伝子特異的プライマー(24 mer を使用した)に相補的な配列を完全に持つ cDNA が PCR によって優先的に増幅されると考えられます。これらの要因によって、24~34 bp の末端逆方向繰返し配列(Terminal Inverted Repeat)を持つ cDNA が選択的に増幅されたと考えられます。

A. RACE PCR

RT-PCR を行うときのように比較的簡単な条件設定の下で RACE PCR を行うことができます。一般に、ホットスタート PCR、タッチダウン PCR あるいはステップダウン PCR のような複雑な条件設定をする必要はありません。
Tm 値は 60℃~65℃に設定してください。反応溶液の組成や Thermal Cycling の条件は、使用する熱安定性 DNA Polymerase の説明書に従って設定して下さい。サイクル数は RT-PCR より 5~10 回多く設定します。また、伸長反応の時間が長い方が Template-switching の機会が増大します(系統的な実証実験はまだ実施していない: 6 ページ [*2]を参照)。そこで、RT-PCR よりも 1 分から 2 分伸長反応の時間を長くして RACE PCR を行うことをお薦めします。

(例)

50 μl で PCR を行なう場合の反応用液の組成

滅菌水	29 μl
10X PCR Buffer	5 μl
Gene-specific (RACE) Primer (10 pmol/μl)	5 μl
2 mM dNTP	5 μl
ds cDNA	5 μl (1~2 ng)
熱安定性 DNA ポリメラーゼ(1 U/μl)	1 μl
Total volume	50 μl

Thermal Cycling は以下のように設定して下さい*。

（例）

94℃	2 min	
98℃	10 sec	┐
Tm(℃)	30 sec	35~40 cycles
68℃	4 min	┘

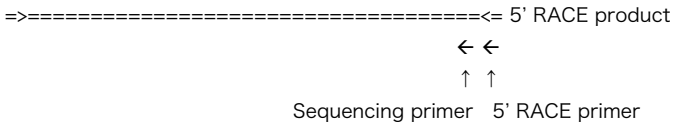
*使用する熱安定性 DNA ポリメラーゼに添付されている説明書の指示に従って PCR の条件設定を行って下さい。

反応液の一部(5~10 μl)と DNA サイズマーカーをアガロースゲル電気泳動に供して RACE 産物の有無を確認して下さい。

B. クローニングと DNA 塩基配列の決定

得られた RACE PCR 産物は TA クローニングベクターにクローニングした後、DNA の塩基配列を決定してターゲット cDNA が増幅されているかどうかを確認することをお薦めします。

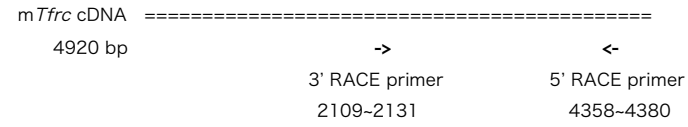
Direct DNA Sequencing によって RACE PCR 産物の確認を行う場合は、もう 1 種類の遺伝子特異的プライマーが必要になります。



C. コントロールm*Tfrc* 5'および3' RACEプライマーの用い方

数回の実験でRACE産物が検出できない場合には、m*Tfrc* 5' RACEプライマーあるいは3' RACEプライマーと作製したds cDNAサンプルを用いてRACE実験を行ってみるのが問題解決の一助になります。

まず両プライマーを用いてm*Tfrc*のRT-PCRを行い、産物が検出できるようにPCRの条件を整えます。次に、それぞれのプライマー単独でRACE PCRを行います。PCRの条件は、サイクル数と伸長反応の時間を除いては、RT-PCRと同様に設定します。サイクル数はRT-PCRより5~10回多く設定します。また上でも述べたように、伸長反応の時間が長い方がTemplate-switchingの機会が増加すると考えられます。まず1分長くしてRACE PCRを行ってみるのが良いと思われます。このコントロール実験でRACE PCRの条件設定の方法を把握できれば、様々なターゲット遺伝子に関してRACEを行うことが容易になると期待されます。



もしこのコントロール実験で望ましい結果が得られなかった場合は、精製したtotal RNAあるいはpoly(A)⁺ RNAもしくは合成したds cDNAに何らかの問題があると考えられます。アガロースゲル電気泳動によるチェック等を行なって問題の所在を確認し、total RNAあるいはpoly(A)⁺ RNAを再度精製し直す等の処置を行なって下さい(VI. A)。

注意：作製した ds cDNA がマウス由来でない場合は、各研究室で使用している生物種の *Tfrc*、*β-actin* 等のコントロールプライマーを用いて上記の実験を行って下さい。

D. コントロールプライマーによる RACE PCR と RT-PCR の実施例

本キットを用いて作製したマウス精巣 ds cDNA (図 1) (IV. 20.で 1/250 希釈したもの)とコントロール m*Tfrc* RACE プライマー(本キットに付属)を使用して 5' RACE PCR と RT-PCR を実施した例を示します。熱安定性 DNA ポリメラーゼは KOD -Plus- Neo (TOYOBO)を使用し、反応溶液の組成と Thermal Cycling の条件は以下のように設定しました。

・RACE PCR

滅菌水	26 μl
10X PCR Buffer	5 μl
Tfrc 5' RACE Primer (10 pmol/μl)	5 μl
2 mM dNTP	5 μl
25 mM $MgSO_4$	3 μl
ds cDNA	5 μl
KOD -Plus- Neo (1 U/μl)	1 μl
Total volume	50 μl

・RT-PCR

滅菌水	28 μl
10X PCR Buffer	5 μl
Tfrc 3' RACE Primer (10 pmol/μl) forward	1.5 μl
Tfrc 5' RACE Primer (10 pmol/μl) reverse	1.5 μl
2 mM dNTP	5 μl
25 mM $MgSO_4$	3 μl
ds cDNA	5 μl
KOD -Plus- Neo (1 U/μl)	1 μl
Total volume	50 μl

Thermal Cycling

94℃	2 min	
98℃	10 sec	┐
63℃	30 sec	├ 40 cycles
68℃	4 min	┘

RACE PCR サンプル 10μl および RT-PCR サンプル 2μl を 1%アガロースゲル電気泳動に使用しました(図 3)。

図 3(p10)に示したように~4.4 kb(全長), ~3 kb, ~2.4 kb 等の 5' RACE の産物(レーン 2~11)と~2.3 kb の RT-PCR の産物(レーン 1)が確認されました。5' RACE は 3 回の実験で得られた結果をまとめたものです。RACE 実験を行った反応チューブ(各 4 チューブずつ)の半分以上で産物が確認されました。産物が得られる割合はターゲット遺伝子によって変動すると考えられます。RACE 産物の量が RT-PCR に比べてかなり少ないのは、テンプレートになる一即ち最初の数サイクルの内に Template-switching が起こった一 cDNA の分子が 1～数分子に限られるためと考えられます。5' RACE の場合、複数のサイズの異なる cDNA 分子に Template-switching が起こった時には、複数のバンドが観察されることがあります。3' RACE の場合は、通常産物のサイズは一定になります。

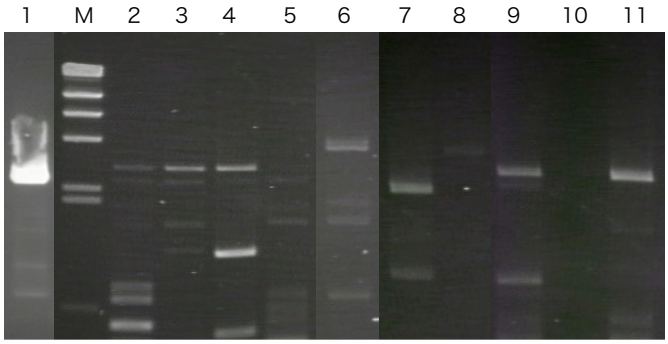


図 3. RACE PCR と RT-PCR の結果

レーン 1: RT-PCR、レーン M: λ *Hin*dIII digestion マーカー、レーン 2~11: 5' RACE PCR、レーン 2~5: 1 回の RACE 実験で得られた結果、レーン 6: cDNA を 1/10 希釈し伸長時間 8 分で得られた結果、レーン 7, 8: cDNA をそれぞれ 1/2 および 1/5 希釈し伸長時間 4 分で得られた結果、レーン 9: 上記の条件、レーン 10, 11: cDNA を 1/2 希釈し伸長時間 4 分で得られた結果、を示している。

通常 RACE 実験を行なう場合は、Tm でまず RACE PCR を行います。もし産物が全く見られない場合には、アニーリングの温度を 1~2℃下げて RACE PCR を行います。多くの非特異的産物と思われるバンドが見られる場合には、アニーリングの温度を 1~2℃上げて RACE PCR を行います。"非特異的産物が見られなくなりほぼ 1 種類の産物に限定されるようになったものが正規の RACE 産物である"という知見を基に実験を行えば成功の確率が高くなると期待されます。その際、cDNA を反応溶液に加えない等のネガティブコントロールの反応チューブを作っておくと結果の解析が行い易くなります。一般に、設計したプライマーに問題がなければ、Tm 付近で RACE 産物が得られると考えて良いと思われます。

E. RACE によってより長い cDNA を得たい場合

シングルプライマーRACE では長い cDNA を増幅することが可能ですが、一般に短い DNA 分子のほうがより環状化が起こり易いので、反応溶液内にターゲットとなる長い cDNA 分子と短い cDNA 分子が混在している場合には短い cDNA 分子の方がシングルプライマーRACE によって増幅され易くなります。

そこで、次の操作を行えばより長い cDNA を得ることが容易になります。合成した ds cDNA を DNA サイズマーカーと共にアガロースゲル電気泳動に供して分画する。高分子の cDNA を含むゲルを切り出して、エレクトロエリューション等(14, 15)や市販の DNA フラグメント抽出キットによって抽出する。抽出した cDNA を TE, pH8.0 で適切な濃度に希釈して、RACE PCR に使用する。

また、RACE PCR の最初の 2-3 サイクルでは伸長反応の時間を 8~10 分間と長くし、それ以降は通常の時間(4 分)に切り替えるとシングルプライマーRACE の長いテンプレートが得られる確率が増大します。また複数のバンドが観察される割合も増加します。図 3 のレーン 6 に示したように全てのサイクルを 8 分間の伸長反応で PCR を行なっても特に問題は生じませんでした。

VI. 問題の発生とその解決法

A. ds cDNA 合成

高品質な poly(A)$^+$ RNA が得られれば、通常 ds cDNA 合成も良い結果が得られます。精製した total RNA の一部をアガロースゲル電気泳動して rRNA (28S RNA および 18S RNA)や tRNA(+5S rRNA)の分解が起こっていないことを確認してから poly(A)$^+$ RNA の精製を行えば、高品質な poly(A)$^+$ RNA を得ることが可能になります。total RNA の約 1%が poly(A)$^+$ RNA として回収されます(14)。

また、精製した poly(A)$^+$ RNA の濃度を計測しておくことは重要です。必ずしも 1 μg の poly(A)$^+$ RNA を cDNA 合成に使用する必要はありませんが、その場合 TE, pH8.0 による ds cDNA の希釈率を変えることが必要になります。RACE 実験の精度を上げるために、可能な限り poly(A)$^+$ RNA の濃度を決定(簡易法でも良い(15A))してから cDNA 合成を行なうことをお薦めします。

B. RACE

数回の RACE PCR 実験を行った結果、非特異的産物が増幅される、RACE 産物が得られない等の問題が生じた場合は：

[1] 正規の産物ではないと思われるものが多く観察される場合には、使用する ds cDNA 量を 1/2, 1/5, 1/10 等に減らす。

[2] 産物がほとんど観察されない場合には、使用する ds cDNA 量を 2 倍、 3倍等にする。

[3] 状況に応じて使用する遺伝子特異的(RACE)プライマー量を変更する。（通常は使用量を減少する。）

以上のような工夫をして RACE PCR を行って下さい。RACE 産物が得られることがあります。

以上のような処置を施しても依然として非特異的産物が増幅される場合には、ホットスタート PCR、タッチダウン PCR 等の方法を使用することによって、RACE 実験の結果が改善される可能性があります。

C. 希少な転写産物の RACE

合成した ds cDNA 内に含まれているターゲット cDNA が非常に少ない場合には、使用する cDNA 量に関わらず RACE PCR の産物がアガロースゲル電気泳動で観察されないことがあります。そのようなときは、初回の RACE PCR サンプルの一部(5~10 μl)を用いて同じ条件で 2 回目の PCR を行うことによって産物が検出できる場合があります。

あるいは、"**V. E.** RACE によってより長い cDNA を得たい場合"と同様に、RACE PCR の最初の 2-3 サイクルで伸長反応の時間を 8~10 分間と長くして、それ以降は通常の時間(4 分)に切り替えると初期のサイクルでシングルプライマーRACE のテンプレートが合成される確率が増すと考えられます。

D. Genomic DNA の偶発的な増幅

シングルプライマー法による RACE は非常に感度が高いので cDNA 内にターゲットが存在しない場合には、poly(A)$^+$ RNA 精製時に混入したごく微量のゲノム DNA に存在するターゲット遺伝子を増幅することがあります。この問題は、poly(A)$^+$ RNA サンプルあるいは total RNA サンプルを RNase フリーの DNase で処理することによって解決されます。ゲノム DNA の増幅による混乱を避けたい場合は、poly(A)$^+$ RNA あるいは total RNA サンプルの DNase 処理をお薦めします。 RNase フリーの DNase で処理した poly(A)$^+$ RNA あるいは total RNA サンプルはフェノール抽出とエタノール沈殿を行って下さい。

もしくは、DNase 処理が可能な市販の RNA 精製用カラム等を使用して total RNA の精製を行うこともできます。

ターゲット遺伝子のエクソン・イントロン構造が既に判明している場合は、RACE プライマーをエクソンとエクソンの接合部を跨ぐように設計することによってこの問題は解決されます。

VII. シングルプライマーRACE 法の重要な特性と応用

[1] 5' RACE および 3' RACE が同じ cDNA を用いて行える。

[2] PCR の複雑な条件設定をする必要はない。RT-PCR のように比較的簡単な PCR の条件設定で効率的な RACE が行える。

[3] 長い cDNA が得られるのでスプライシングバリアントの探索等に適している。短いものはより高効率で得られる。

[4] 一旦 ds cDNA を合成すれば、λファージベクターへのクローニングをせずに、そのまま cDNA ライブラリーとして使用することができる。

[5] 1 種類の遺伝子特異的プライマーのみで RACE PCR による cDNA ライブラリーのスクリーニングができる。

[6] *in vitro* DNA 組換え法を用いることによって、5'および 3' RACE 産物から容易に全長 cDNA が得られる。

[7] T4 DNA ポリメラーゼによる ds cDNA 末端の平滑化処理およびアダプターあるいはアンカーのライゲーションが cDNA ライブラリーの作製に必要ないー即ち cDNA ライブラリーのサイズが T4 DNA ポリメラーゼ処理およびライゲーションの効率に左右されないーので、希少な mRNA (16, 17)に由来する cDNA も効率的に単離することができる(18, 19)。

[8] 本 RACE キットを使用することによって、Expressed Sequence Tag (EST) (20)や Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) (21)あるいは Differential Display (22)による解析で得られた短い RNA 配列の情報を基にして全長 cDNA を単離し、より詳細にその特性の解析を行なうことができる。

[9] microRNA (pri-miRNA) (23)や lncRNA (24, 25)等も、本キットで作製した cDNA およびシングルプライマーRACE 法を用いて単離し、その特性を解析することができる。上記[8]で検出される可能性が考えられる。

[10] 種々の生物のゲノム DNA の増幅にもシングルプライマー法を応用することができる。とりわけ、挿入変異誘発(insertional mutagenesis)に使用した DNA エレメントをゲノム DNA からレスキューして挿入変異が起こった遺伝子を特定する方法として非常に有用である。また、トランスジェニック生物(細胞)の作製に使用したベクターDNA が挿入されているゲノム DNA の部位を容易に決定することができる。

VIII. Conclusion 推断

以上のように、シングルプライマー法を使用した本キット accura-expRACE KIT を用いて様々な反応条件下で多数のプライマーを用いて RACE 実験を行なうことによって、存在している cDNA はほぼ全てが増幅されてクローニング可能になることが期待されます。

IX. 参考文献

1. Okayama, H. & Berg, P. (1982) High-efficiency cloning of full-length cDNA. Mol. Cell. Biol. 2, 161-170.
2. Gubler, U. & Hoffman, B.J.(1983) A simple and very effective method for generating cDNA libraries. Gene 25, 263-269.
3. Frohman, M.A., Dush, M.K. & Martin, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002.
4. Chenchik, A., Diachenko, L., Moqadam, F., Tarabykin, V., Lukyanov, S. & Siebert, P.D. (1996) Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. BioTechniques 21, 526-534.
5. Hirano, M. (2004) RACE using only a gene-specific primer: application of a template-switching model. Mol. Biotechnol. 27, 179-186.
6. Levene, S.D. & Crothers, D.M. (1986) Ring closure probabilities for DNA fragments by Monte Carlo simulation. J. Mol. Biol. 189, 61-72.
7. Cloutier, T.E. & Widom, J. (2004) Spontaneous sharp bending of double-stranded DNA. Molec. Cell 14, 355-362.
8. Du, Q., Smith, C., Shiffeldrim, N., Vologodskaia, M. & Vologodskii, A. (2005) Cyclization of short DNA fragments and bending fluctuations of the double helix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 5397-5402.
9. Panganiban, A. T. & Temin, H. M. (1983) The terminal nucleotides of retrovirus DNA are required for integration but not virus production. Nature 306, 155–160.
10. Wang, K. & Pearson, G. D. (1985) Adenovirus sequences required for replication in vivo. Nucleic Acids Res. 13, 5173–5187.
11. Olasz, F., Farkas, T., Kiss, J., Arini, A., & Arber, W. (1997) Terminal inverted repeats of insertion sequence IS30 serve as targets for transposition. J. Bacteriol. 179, 7551–7558.
12. Calvi, B. R., Hong, T. J., Findley, S. D., & Gelbart, W. M. (1991) Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: hobo, Activator, and Tam3. Cell 66, 465–471.
13. Morgan, G. T. (1995) Identification in the human genome of mobile elements spread by DNA-mediated transposition. J. Mol. Biol. 254, 1–5.
14. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J. A. & Struhl, K. (Eds) (1994) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
15. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
16. Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D.A., Duttagupta, R., Willingham, A.T., Stadler, P.F., Hertel, J., Hackermüller, J., Hofacker, I.L., Bell, I, Cheung, E., Drenkow, J., Dumais, E., Patel, S., Helt, G., Ganesh, M., Ghosh, S., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Tammana, H. & Gingeras, T.R. (2007) RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. Science 316, 1484-1488.
17. Mercer, T.R., Gerhardt, D.J., Dinger, M.E., Crawford, J., Trapnell, C., Jeddeloh, J.A., Mattick, J.S. & Rinn, J.L. (2012) Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. Nature Biotechnol. 30, 99–104.
18. Hirano, M. & Noda, T., (2004) Genomic organization of the mouse Msh4 gene producing bicistronic, chimeric and antisense mRNA. Gene 342, 165-177.
19. Hirano, M. (2008) Natural Grp78 antisense RNA induces apoptosis by creating a chimeric mRNA with Msh4 pre-mRNA. In A. G. Hernandes, (Ed), Antisense Elements (Genetics) Research Focus, (pp 27-69), Nova Science Publishers, Inc., New York.
20. Sikela, J.M. & Auffray, C. (1993) Finding new genes faster than ever. Nature Genet. 3, 189-191.
21. Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., & Kinzler, K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. Science 270, 484-487.
22. Liang, P. & Pardee, A. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257, 967-970.
23. Yates, L.A., Norbury, C.J. & Gilbert, R.J.C. (2013) Long and short of microRNA. Cell 153, 516-519.
24. Numata, K., Kanai, A., Saito, R., Kondo, S., Adachi, J., Wilming, L.G., Hume, D.A., Hayashizaki, Y. & Tomita, M. (2003) Identification of putative noncoding RNAs among the RIKEN mouse full-length cDNA collection. Genome Res. 13, 1301-1306.
25. Nam, J-.W. & Bartel, D.P. (2012) Long noncoding RNAs in C. elegans. Genome Res. 22, 2529-2540.

注) 本キットを使用後、中箱はチューブスタンドとして使用できます。

accra-expRACE KIT に関するご意見、ご質問等は Email: contact@elplain.com までご連絡ください。
テクニカルサポート　Email: tech@elplain.com
エルプレイン研究所の承認を得ずに製品の再販、再販のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。本印刷物に記載されている会社名あるいは商品名等は、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは所有者に帰属します。
シングルプライマー法は日本国特許第 4,304,350 号、U.S. patent No. 7,504,240 によって保護されています。

株式会社エルプレイン研究所
〒111-0033
東京都台東区花川戸 1-12-2
TEL: 03-6231-6605
Email: contact@elplain.com

accura-expRACE KIT

[ækjurə-ikspré(i)s]

El Plain Institute

Revolutionary
Tools for
Continual
Discovery

For Research Use Only

Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

Code No.	EPI001-EX
Lot No.	0001
Storage	–20°C

Contents

I. Kit Components 3
A. First-Strand cDNA Synthesis 3
B. Second-Strand cDNA Synthesis 3
C. Other Reagents 3
D. RACE PCR 4
II. Other Materials Required 4
III. First-Strand cDNA Synthesis 4
IV. Second-Strand cDNA Synthesis 5
V. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 7
A. RACE PCR 8
B. Cloning and DNA Sequencing 8
C. How to Use Control m*Tfrc* 5' and 3' RACE Primers 9
D. Example of RACE PCR and RT-PCR Experiments Using Control Primers 10
E. Procedure for Obtaining Longer cDNA by RACE 11
VI. Troubleshooting 12
A. ds cDNA Synthesis 12
B. RACE 12
C. RACE of Rare Transcripts 12
D. Accidental Amplification of the Genomic DNA 13
VII. Significant Advantages of the Single-Primer RACE Method and Its Applications 13
VIII. Conclusion 14
IX. References 14

User Manual

This kit contains reagents for five double-stranded (ds) cDNA synthesis reactions and control primers for 5' and 3' RACE PCR. A thermostable DNA polymerase for PCR is not included in the kit. Preparation of poly(A)$^+$ RNA is required*.

I. Kit Components

A. First-Strand cDNA Synthesis

1. 100 µl 5X RTase (Reverse Transcriptase) Buffer
   250 mM Tris-HCl, pH 8.3
   375 mM KCl
   15 mM $MgCl_2$
2. 10 µl Oligo$(dT)_{20}$ Primer (10 µM)
3. 5.5 µl M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (Advanced Type) (50 U/µl)
   Source: An *E. coli* strain carrying a recombinant plasmid

B. Second-Strand cDNA Synthesis

4. 200 µl 5X Second-Strand Synthesis Buffer
   100 mM Tris-HCl, pH 7.5
   500 mM KCl
   25 mM $MgCl_2$
   50 mM $(NH4)_2SO_4$ (Ammonium Sulfate)
   5 mM Dithiothreitol (DTT)
   0.25 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)
   0.75 mM β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide (β-NAD)
5. 5.5 µl *E. coli* RNase H (1 U/µl) Source: An *E. coli* strain carrying a recombinant plasmid
6. 5.5 µl *E. coli* DNA ligase (5 U/µl) Source: An *E. coli* strain carrying a recombinant plasmid
7. 11 µl *E. coli* DNA polymerase I (12 U/µl) Source: An *E. coli* strain carrying a recombinant plasmid
8. 300 µl EDTA (0.5 M EDTA, pH 8.0)

C. Other Reagents

9. 40 µl 10 mM dNTP Mix (10 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
10. 500 µl 7.5 M Ammonium Acetate
11. 1.7 ml Distilled Water, Deionized, Sterile
12. 1.6 ml TE, pH 8.0
    10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
    1 mM EDTA (pH 8.0)

*BioMag® mRNA Purification Kit (Polysciences), NucleoTrap® mRNA (MACHEREY-NAGEL), FastTrack® 2.0 mRNA Isolation Kit (Life Technologies), Absolutely mRNA Purification Kit (Agilent Technologies), etc. can be used for preparation of poly(A)$^+$ RNA.

D. RACE PCR

Control 5' and 3' RACE Primers

13. 200 µl Mouse Transferrin Receptor (*Tfrc*) 5' RACE Primer (10 pmol/µl):
    5'-TTCTCAGGTGGCAGCTTTGAACT-3' (Tm 62.58°C)
14. 200 µl Mouse Transferrin Receptor (*Tfrc*) 3' RACE Primer (10 pmol/µl):
    5'-CGTGGAGACTACTTCCGTGCTAC-3' (Tm 62.55°C)
    (Full-length cDNA ~4.9 kb)

Note: Kit components are arranged in a row from left to right according to the approximate order of use in an experiment.

II. Other Materials Required

1. Thermostable DNA polymerase for PCR (PrimeSTAR (TaKaRa), KOD (TOYOBO), Pfu (Thermo Fisher Scientific), Phusion (New England Biolabs), etc.)
2. Phenol (TE, pH 8.0 saturated)
3. 95% Ethanol
4. 75% Ethanol
5. TE, pH 8.0

III. First-Strand cDNA Synthesis

This procedure is a method for synthesizing first-strand cDNA by the use of an advanced type M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase. Because this enzyme has very high extension ability, it can effectively synthesize long first-strand cDNA. Even if the RNA, which tends to form a large secondary structure, is used as a template, this enzyme is able to synthesize the first-strand cDNA efficiently at the usual reverse-transcription temperature (42°C). This enzyme is suitable for the synthesis of long cDNA and construction of a cDNA library containing a high proportion of full-length cDNA.

Conditions of First-Strand cDNA Synthesis Reaction

5X RTase Buffer	2 µl
10 mM dNTP	1 µl
10 µM oligo(dT)$_{20}$	1 µl
poly(A)$^+$ RNA	1 µg (1-5 µl)
M-MLV RTase (Advanced Type) (50 U/µl)	1 µl
Distilled water	(4-0) µl
Total volume	10 µl

1. poly(A)$^+$ RNA, oligo(dT)$_{20}$ primer, and distilled water should be thawed on ice. A sterile 0.5 ml

microcentrifuge tube should be precooled on ice. 5X RT buffer and 10 mM dNTP mix should also be thawed on ice.

2. Add 1 µg of poly(A)$^+$ RNA (1-5 µl) and 1 µl of oligo(dT)$_{20}$ primer into a sterile 0.5 ml microcentrifuge tube.
3. Add distilled water to a volume of 6 µl.
4. Mix gently by pipetting and then spin down the contents in the microcentrifuge at 4°C.
5. Incubate the tube at 70°C for 3 min.
6. Immediately cool the tube on ice for 3 min.
7. Briefly spin down the contents in a microcentrifuge at 4°C.
8. Add the following to a reaction tube:

5X RTase Buffer	2 µl
10 mM dNTP	1 µl
M-MLV RTase (Advanced Type) (50 U/µl)	1 µl
Total volume	10 µl

9. Mix gently by pipetting.
10. Briefly spin down the contents in a microcentrifuge at 4°C.
11. Incubate the tube at 42°C for 1 hr.
12. Cool the tube on ice for 2~3 min.
13. Perform second-strand synthesis continuously in the same tube.

IV. Second-Strand cDNA Synthesis

Second-strand cDNA synthesis is performed in the same reaction tube as first-strand synthesis. *E. coli* RNase H, *E. coli* DNA polymerase I, and *E. coli* DNA ligase degrade the RNA of RNA-DNA hybrids and synthesize second-strand cDNA (1, 2). The treatment of ds cDNA with T4 DNA polymerase is not necessary with this kit because an adaptor or an anchor ligation is not necessary for the next RACE experiment. The RACE experiment can be performed as soon as the second-strand cDNA synthesis is finished.

1. 5X Second-strand buffer, dNTP mix, and sterile water should be thawed on ice.
2. Add the following into the first-strand reaction tube:

(First-Strand Mixture	10 µl)
Distilled water	48.4 µl
5X Second-Strand Buffer	16 µl
dNTP Mix (10 mM)	1.6 µl

Mix by vortexing and add enzymes.

E. coli RNase H	1U	1 µl
E. coli DNA ligase	5U	1 µl
E. coli DNA polymerase I	24U	2 µl
Total volume		80 µl

3. Mix gently by pipetting.
4. Briefly spin down the contents in a microcentrifuge at 4°C.
5. Incubate the tube at 16°C for 1.5 hr.

6. Add 1.6 µl of 0.5 M EDTA (pH 8.0) to stop the reaction.
7. Add 80 µl of TE-saturated phenol (pH 8.0) and vortex thoroughly.
8. Spin the tube at maximum speed in a microcentrifuge for 10 min at room temperature.
9. Transfer the aqueous phase to a sterile 0.5 ml microcentrifuge tube.
10. Add 29 µl of 7.5 M ammonium acetate (final concentration, 2 M).
11. Add 2.5 volumes of 95% ethanol (272.5 µl) and mix thoroughly.
12. Place the tube at –20°C for 1 hr.
13. Spin the tube at maximum speed in a microcentrifuge for 20 min at 4°C.
14. Carefully remove the supernatant.
15. Add 400 µl of prechilled 75% ethanol at –20°C.
16. Spin the tube at maximum speed in a microcentrifuge for 5 min at 4°C.
17. Carefully remove the supernatant.
18. Dry the pellet for 5~10 min.
19. Dissolve the pellet in 10 µl TE, pH 8.0.
20. Dilute 1 µl of ds cDNA with 250-500 µl of TE, pH 8.0 to a concentration of 0.2~0.4 µg/ml.

Instead of monitoring cDNA synthesis by labeling with [α-^{32}P]dCTP, you can check an aliquot (1 µl) of ds cDNA products (10 µl TE, pH 8.0 solution) by agarose gel electrophoresis (Figure 1).

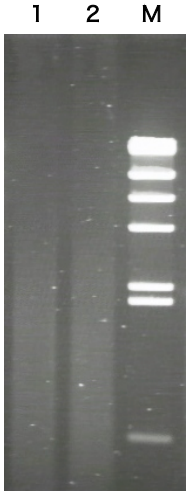


Figure 1. Result of ds cDNA Synthesis

ds cDNA synthesis was performed using mouse testis poly(A)$^+$ RNA. 1 µl of ds cDNA (#19 on page 5) was used for 1% agarose gel electrophoresis. Lanes 1, 2: Different kits were used. Lane M: *Hin*dIII-digested λ DNA.

Anticipated Results

It is expected that 0.2~1 µg of ds cDNA will be obtained from 1 µg of poly(A)$^+$ RNA.

V. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) (3, 4)

In RACE PCR by the single-primer method[*1] using this kit, an adaptor primer or an anchor primer is not used. The targeted cDNA is amplified with only a gene-specific primer (5). The basis for its mechanism (Figure 2) is that the terminal region of the ds DNA is partially denatured at 68°C for the extension reaction as is observed at the cohesive end of the λ phage and that the linear DNA molecule tends to be circular (6, 7, 8). Upon reaching the 5' end of the template DNA under these circumstances, a thermostable DNA polymerase switches the template to the 5' terminal region on the newly synthesized daughter strand at a certain probability[*2]. The DNA polymerase continues synthesizing DNA sequences complementary to the gene-specific primer, occasionally adding several nucleotides from the 3' flanking sequence. Using this daughter strand as a template, the targeted cDNA is accurately amplified by PCR using only a gene-specific primer. It is through this process that the resultant cDNA likely obtains its characteristic terminal inverted repeat (9, 10, 11, 12, 13) (Figure 2. legend).

[*1] The single-primer method is covered by U.S. patent No. 7504240 and Japanese patent No. 4304350.

[*2] The exact frequency is currently unknown. It is assumed that the frequency is different according to the size of the DNA fragments. It is also assumed that it is different according to the thermostable DNA polymerase used.

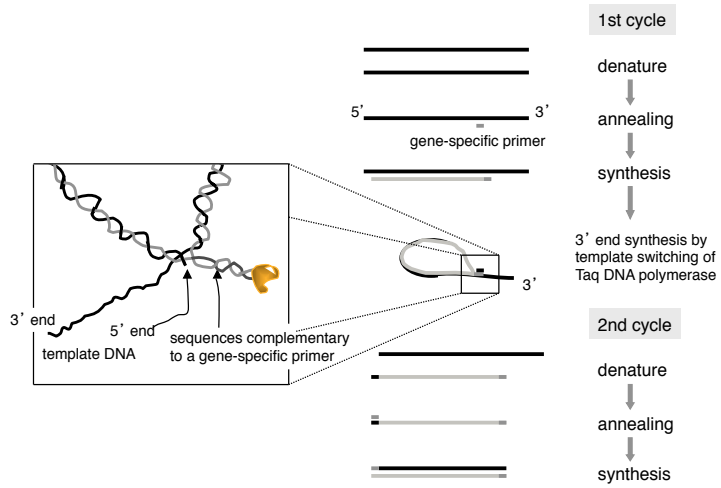


Figure 2. Mechanism of RACE Reactions Using a Single Gene-Specific Primer.

The template-switching event probably occurs at a variety of positions. However, the length of the terminal inverted repeat falls in the range of 24-34 bp in every obtained cDNA clone (1 and data not shown). Possible reasons for this fact are as follows. A region that dissociates from dsDNA by heat denaturation may be limited within the first 40 bp or less at the DNA end at 68°C. The length of denaturation might also depend on the GC content. In addition, only the cDNA having the nucleotide sequence perfectly complementary to the gene-specific primer (24 bases) is then selectively amplified in the subsequent cycles of PCR. These factors are thought to cause predominant amplification of cDNA having terminal inverted repeat of 24-34 bp. Complementary DNA, which has a terminal inverted repeat structure comprising a gene-specific primer with or without several nucleotides adjacent to its 3' end, is made (amplified) by the proposed mechanism described above.

By using the ds cDNA synthesized by this kit as a template for PCR, both 5' RACE and 3' RACE can be performed.

A. RACE PCR

RACE PCR can easily be performed under the condition such as RT-PCR. Generally, complicated modifications such as hot-start PCR, touchdown PCR and stepdown PCR are not necessary. Recommended Tm is 60°C-65°C. We recommend that the composition of the reaction mix and the condition of thermal cycling are prepared according to the instruction of manufacturer of thermostable DNA polymerase. Cycling is needed 5 to 10 times more than that of RT-PCR. A longer extension time tends to increase the chance for template-switching of thermostable DNA polymerase (systematic studies have not yet been done: see *2 on page 7). Therefore, we recommend that RACE PCR be performed for 1-2 minutes longer than that of RT-PCR.

Example
For 50 µl PCR, mix the following reagents:

Distilled water	29 µl
10X PCR Buffer	5 µl
Gene-Specific (RACE) Primer (10 pmol/µl)	5 µl
2 mM dNTP	5 µl
ds cDNA	5 µl (1-2 ng)
Thermostable DNA polymerase (1 U/µl)	1 µl
Total volume	50 µl

Start thermal cycling using the following parameters*:

94°C	2 min	
98°C	10 sec	35~40 cycles
Tm°C	30 sec	
68°C	4 min	

* PCR should be performed under the conditions described in the instructions used for thermostable DNA polymerase.

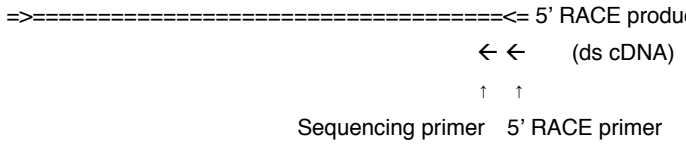
To characterize RACE products, 5~10 µl of the reaction mix is examined by agarose gel electrophoresis.

B. Cloning and DNA Sequencing

It is necessary that RACE PCR products be cloned to a TA cloning vector and confirmed by DNA sequencing.

To perform direct DNA sequencing to confirm RACE PCR products, another gene-specific primer is required. For 5' RACE products, a primer of 3' distal region to a 5' RACE primer is required. For 3' RACE

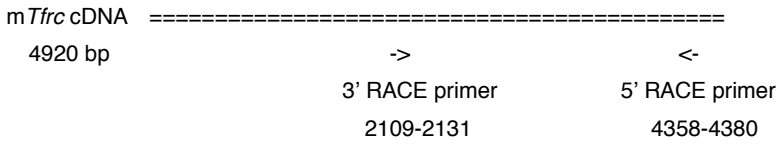
products, a primer of 3' distal region to a 3' RACE primer is required.



C. How to Use Control m*Tfrc* 5' and 3' RACE Primers

If you cannot detect the RACE product in several experiments, performing a RACE experiment using control m*Tfrc* 5' and 3' RACE primers and synthesized ds cDNA may help solve the problem.

At first, using both primers, perform RT-PCR of the m*Tfrc* for detecting the product of ~2.3 kb. Next, perform RACE using a control m*Tfrc* 5' or 3' RACE primer under the same conditions as RT-PCR except for thermal cycling time. For RACE, set the thermal cycling 5 to 10 more times than that of RT-PCR. As mentioned above, a longer extension time tends to increase the chance of template-switching of thermostable DNA polymerase. We recommend that RACE PCR be performed with 1-2 minutes longer extension time than that for RT-PCR. If you can use these control experiments to determine the appropriate conditioning procedure of RACE PCR, you will easily perform RACE experiments for various targeted genes.



if you failed to obtain the desired results in these control experiment, it is presumed that there is a problem with the prepared total RNA or poly(A)$^+$ RNA or synthesized ds cDNA. In that case, confirm where the problem is by performing agarose gel electrophoresis of the prepared total RNA or poly(A)$^+$ RNA or synthesized ds cDNA. Depending on the circumstances, total RNA or poly(A)$^+$ RNA may have to be prepared again. See VI. A.

Note: If the synthesized ds cDNA is not derived from mouse, perform the experiment described above using control primers (e.g., *TFR*, β-*actin*, etc.) of the organism under study.

D. Example of RACE PCR and RT-PCR Experiments Using Control Primers

Using mouse testis synthesized ds cDNAs above (Figure 1; Lanes 1 and 2, 1/250 diluted) and control m*Tfrc* RACE primers contained in this kit, we performed 5' RACE and RT-PCR experiments. We used KOD -Plus- Neo DNA polymerase (TOYOBO; not available in the US) and prepared the reaction mix under the thermal cycling conditions listed below.

・RACE PCR

Distilled water	26 µl
10X PCR Buffer	5 µl
Tfrc 5' RACE Primer (10 pmol/µl)	5 µl
2 mM dNTP	5 µl
25 mM $MgSO_4$	3 µl
ds cDNA	5 µl
KOD -Plus- Neo (1 U/µl)	1 µl
Total volume	50 µl

・RT-PCR

Distilled water	28 µl
10X PCR Buffer	5 µl
Tfrc 3' RACE Primer (10 pmol/µl) forward	1.5 µl
Tfrc 5' RACE Primer (10 pmol/µl) reverse	1.5 µl
2 mM dNTP	5 µl
25 mM $MgSO_4$	3 µl
ds cDNA	5 µl
KOD -Plus- Neo (1 U/µl)	1 µl
Total volume	50 µl

Thermal Cycling

94°C	2 min	
98°C	10 sec	┐
63°C	30 sec	40 cycles
68°C	4 min	┘

To characterize 5' RACE and RT-PCR products, 10 µl and 2 µl of the reaction mix, respectively, are examined by agarose gel electrophoresis.

As shown in Figure 3, 5' RACE products of ~4.4 kb, ~3 kb, ~2.4 kb, etc. (Lanes 2~11) and RT-PCR product of ~2.3 kb (Lane 1) were observed. Shown are some of the results of three 5' RACE experiments.

The RACE products are observed in more than half of the tubes (4 tubes were used in an experiment). The ratio of obtained RACE product is thought to fluctuate according to the targeted gene. The amount of RACE product is much less than that of RT-PCR. The reason for this is presumed to be that the template of single-primer RACE, in which template-switching has occurred appropriately, is limited to one or a few molecules in the initial few cycles of PCR. In the case of 5' RACE, several bands will be observed when template-switching has occurred in several cDNAs of different sizes. In the case of 3' RACE, the product size is generally identical.

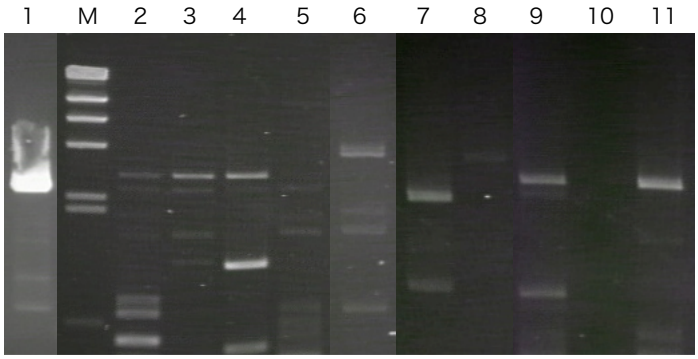


Figure 3. Results of 5' RACE and RT-PCR.

Lane 1: RT-PCR. Lane M: *Hin*dIII-digested λ DNA. Lanes 2~11: 5' RACE PCR. Lanes 2~5: Results of a single RACE experiment. Lane 6: Extension time set to 8 min; cDNA was diluted 10-fold. Lanes 7, 8: Extension time set to 4 min; cDNA was diluted 2- and 5-fold, respectively. Lane 9: Same conditions as above. Lanes 10, 11: Extension time set to 4 min; cDNA was diluted 2-fold.

In general, the first RACE experiment is performed at the Tm temperature of the RACE primer(s). If any of the RACE products cannot be observed, we suggest that the RACE experiment be performed at an annealing temperature of 1-2°C lower. To observe nonspecific products, we suggest that the RACE experiment be performed at an annealing temperature of 1-2°C higher. A RACE product that becomes almost a single band is likely to be the true product. This is the key to successful RACE experiments. Generally, if the designed PCR primer is appropriate for the RACE experiment, you may expect to obtain good results at or near the Tm temperature.

E. Procedure for Obtaining Longer cDNA by RACE

Long cDNA can be amplified using the single-primer RACE method. However, in general, short DNA molecules tend to circularize more efficiently than do long DNA molecules. When long target cDNA and short target cDNA are present in the same reaction mix, the short cDNA is more apt to be amplified by the single-primer RACE method.

Therefore, it becomes easy to get long cDNA by performing the following manipulations. Synthesized ds cDNA is fractionated by agarose gel electrophoresis. The agarose gel block containing high molecular weight cDNA is cut out and eluted by electroelution (14, 15) or by use of a commercially available DNA

elution kit. The eluted cDNA is resuspended in an appropriate volume of TE, pH 8.0 and used for RACE experiments.

The probability for synthesizing a long template for single-primer RACE increases by setting the extension time to 8~10 min in the initial few PCR cycles. Residual cycles are done at 4 min of extension time. The probability observing several RACE product bands may also increase. There have been no problems when the PCR extension time is set to 8 min in all PCR cycles, as shown in Lane 6 of Figure 3.

VI. Troubleshooting

A. ds cDNA Synthesis

If high quality poly(A)$^+$ RNA is obtained, ds cDNA synthesis is successful. Before preparing poly(A)$^+$ RNA, examine the quality of the prepared total RNA by performing agarose gel electrophoresis using a portion of the prepared total RNA. If rRNA (28S RNA and 18S RNA) and tRNA(+5S rRNA) are not degraded, high quality poly(A)$^+$ RNA can be prepared from this total RNA. About 1% of total RNA is collected as poly(A)$^+$ RNA (14).

It is important to measure the concentration of prepared poly(A)$^+$ RNA. Although it is not always necessary to use 1 µg of poly(A)$^+$ RNA for cDNA synthesis, in that case it is necessary to change the dilution rate of ds cDNA by TE, pH 8.0. To raise the accuracy of the RACE experiments, we recommend performing cDNA synthesis whenever possible after determining the concentration of poly(A)$^+$ RNA (a simple method may be used (15A)).

B. RACE

If you cannot obtain a good result of RACE through several replications of experiments, for example amplifying nonspecific products or amplifying no product, attempt the next modification.

[1] If excessive non-specific products were observed, reduce ds cDNA for RACE PCR to 1/2, 1/5, or 1/10, etc.

[2] If no product was observed, increase ds cDNA for RACE PCR to 2-, 3-, or 5-fold, etc.

[3] If undesirable results were obtained, change the amount of a gene-specific primer used for RACE PCR. Generally, reduce a gene-specific primer.

These modifications should produce good results.

If a nonspecific product is amplified after these modifications, try to perform the hot-start method or touchdown PCR. This might improve the RACE results.

C. RACE of Rare Transcripts

If the content of the target cDNA contained in the ds cDNA synthesized by this kit is very low, the RACE product might not be observed by agarose gel electrophoresis. In that case, we recommend that a second round of PCR be carried out under the same condition using 5-10 µl of the first-round sample. In this experiment, the RACE product may then be observed by agarose gel electrophoresis.

As with "**V. E.** Procedure for Obtaining Longer cDNA by RACE," prolonging the extension time of the initial few PCR cycles to 8~10 min increases the probability of synthesizing a rare template for the single-primer RACE.

D. Accidental Amplification of the Genomic DNA

The efficiency of the single-primer method of RACE is very high. If the targeted cDNA is not in the synthesized cDNAs, the targeted gene present in a very small amount of genomic DNA contaminated through the preparation of poly(A)$^+$ RNA is often amplified by PCR. This problem is avoided by the treatment of poly(A)$^+$ RNA or total RNA with RNase-free DNase. Poly(A)$^+$ RNA or total RNA treated by RNase-free DNase should be extracted with phenol and precipitated with ethanol.

Alternatively, genomic DNA-free total RNA can be prepared by commercially available columns for RNA preparation capable of DNase treatment.

If the exon-intron structure of the targeted gene is already known, this problem is solved by designing a RACE primer spanning an exon-exon junction.

VII. Significant Advantages of the Single-Primer RACE Method and Its Applications

[1] Both 5' and 3' RACE can be done with the same cDNA.

[2] Simple PCR protocols without complicated modifications are available for efficient RACE.

[3] Because long cDNA can be obtained, the method is suitable for searching splicing variants of many genes. Short cDNA can be obtained more efficiently than a longer one.

[4] Once double-stranded cDNA is synthesized, it can be used as a cDNA library without adaptor ligation or cloning into a λ phage vector.

[5] Only a single gene-specific primer is necessary for screening a cDNA library using RACE PCR.

[6] Using the recombinant DNA method, full-length cDNA can easily be obtained from 5’ and 3’ RACE products.

[7] T4 DNA polymerase treatment for creating blunt ends on ds cDNA and ligation of an adaptor or an anchor DNA are not necessary for cDNA library construction. Specifically, the efficiency of T4 DNA polymerase treatment and ligation does not influence a library size. Therefore, cDNA derived from rare mRNA (16, 17) can efficiently be isolated (18, 19).

[8] By using this RACE kit, full-length cDNA can be isolated from short RNA sequence information based on Expressed Sequence Tag (EST) (20), Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) (21), or Differential Display (22) analysis, enabling investigation of its detailed characteristics.

[9] By using this RACE kit, microRNA (pri-miRNA) (23) and lncRNA (24, 25) can be isolated and their characteristics analyzed. Detection is possible from analyses of [8].

[10] Amplification of genomic DNA of various organisms can be performed using the single-primer method. The single-primer method is especially useful for identifying gene-occurred insertional mutation by rescuing a DNA element used for insertional mutagenesis. The single-primer method can also be used to identify the insertion site of the vector DNA used for creating transgenic organisms including cells.

VIII. Conclusion

It is expected that almost all existing cDNAs can be amplified by performing RACE experiments under various reaction conditions and with various primers using the accura-expRACE KIT. Then, they can be cloned.

IX. References

1. Okayama, H. & Berg, P. (1982) High-efficiency cloning of full-length cDNA. Mol. Cell. Biol. 2, 161-170.
2. Gubler, U. & Hoffman, B.J.(1983) A simple and very effective method for generating cDNA libraries. Gene 25, 263-269.
3. Frohman, M.A., Dush, M.K. & Martin, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002.
4. Chenchik, A., Diachenko, L., Moqadam, F., Tarabykin, V., Lukyanov, S. & Siebert, P.D. (1996) Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. BioTechniques 21, 526-534.
5. Hirano, M. (2004) RACE using only a gene-specific primer: application of a template-switching model. Mol. Biotechnol. 27, 179-186.
6. Levene, S.D. & Crothers, D.M. (1986) Ring closure probabilities for DNA fragments by Monte Carlo simulation. J. Mol. Biol. 189, 61-72.
7. Cloutier, T.E. & Widom, J. (2004) Spontaneous sharp bending of double-stranded DNA. Molec. Cell 14, 355-362.
8. Du, Q., Smith, C., Shiffeldrim, N., Vologodskaia, M. & Vologodskii, A. (2005) Cyclization of short DNA fragments and bending fluctuations of the double helix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 5397-5402.
9. Panganiban, A. T. & Temin, H. M. (1983) The terminal nucleotides of retrovirus DNA are required for integration but not virus production. Nature 306, 155–160.
10. Wang, K. & Pearson, G. D. (1985) Adenovirus sequences required for replication in vivo. Nucleic Acids Res. 13, 5173–5187.
11. Olasz, F., Farkas, T., Kiss, J., Arini, A., & Arber, W. (1997) Terminal inverted repeats of insertion sequence IS30 serve as targets for transposition. J. Bacteriol. 179, 7551–7558.
12. Calvi, B. R., Hong, T. J., Findley, S. D., & Gelbart, W. M. (1991) Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: hobo, Activator, and Tam3. Cell 66, 465–471.
13. Morgan, G. T. (1995) Identification in the human genome of mobile elements spread by DNA-mediated transposition. J. Mol. Biol. 254, 1–5.
14. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J. A. & Struhl, K. (Eds) (1994) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
15. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
16. Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D.A., Duttagupta, R., Willingham, A.T., Stadler, P.F., Hertel, J., Hackermüller, J., Hofacker, I.L., Bell, I, Cheung, E., Drenkow, J., Dumais, E., Patel, S., Helt, G., Ganesh, M., Ghosh, S., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Tammana, H. & Gingeras, T.R. (2007) RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. Science 316, 1484-1488.
17. Mercer, T.R., Gerhardt, D.J., Dinger, M.E., Crawford, J., Trapnell, C., Jeddeloh, J.A., Mattick, J.S. & Rinn, J.L. (2012) Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. Nature Biotechnol. 30, 99–104.
18. Hirano, M. & Noda, T., (2004) Genomic organization of the mouse Msh4 gene producing bicistronic, chimeric and antisense mRNA. Gene 342, 165-177.

19. Hirano, M. (2008) Natural Grp78 antisense RNA induces apoptosis by creating a chimeric mRNA with Msh4 pre-mRNA. In A. G. Hernandes, (Ed), Antisense Elements (Genetics) Research Focus, (pp 27-69), Nova Science Publishers, Inc., New York.
20. Sikela, J.M. & Auffray, C. (1993) Finding new genes faster than ever. Nature Genet. 3, 189-191.
21. Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., & Kinzler, K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. Science 270, 484-487.
22. Liang, P. & Pardee, A. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257, 967-970.
23. Yates, L.A., Norbury, C.J. & Gilbert, R.J.C. (2013) Long and short of microRNA. Cell 153, 516-519.
24. Numata, K., Kanai, A., Saito, R., Kondo, S., Adachi, J., Wilming, L.G., Hume, D.A., Hayashizaki, Y. & Tomita, M. (2003) Identification of putative noncoding RNAs among the RIKEN mouse full-length cDNA collection. Genome Res. 13, 1301-1306.
25. Nam, J-.W. & Bartel, D.P. (2012) Long noncoding RNAs in C. elegans. Genome Res. 22, 2529-2540.

Note: After this kit is used, the box found inside can be used as a tube stand.

If you have any questions or any opinions about the accura-expRACE KIT, please contact us by email at: contact@elplain.com

Technical Support Email: tech@elplain.com

El Plain Institute products may not be resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products without written approval of El Plain Institute. A company name or a brand name mentioned in this manual is a trade name of each company, or a registered or unregistered trademark, and these belong to each owner.

The single-primer method is covered by U.S. Patent #7,504,240 and Japanese Patent #4,304,350.

© 2013, El Plain Institute Inc. All rights reserved.

El Plain Institute Inc.
1-12-2 Hanakawado, Taito-ku
Tokyo 111-0033, Japan
Email: contact@elplain.com